

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Mai 2001 (31.05.2001)

PCT
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/37959 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: B01D 15/02,
B01J 20/32

35516 Münzenberg (DE). CZERMAK, Peter [DE/DE];
Wingertsberg 41c, 35576 Wetzlar (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/11520

(74) Anwalt: KÖSTER, Hajo; Pippinplatz 4a, 82131 Gauting
(DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. November 2000 (20.11.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (national): AL, AU, BR, CA, IL, JP,
LT, LV, MK, NO, NZ, RO, SI, US, ZA.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 56 010.2 20. November 1999 (20.11.1999) DE

Veröffentlicht:
— Mit internationalem Recherchenbericht.
— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): SCINU TEC GMBH [DE/DE]; Ricarda-Huch-Str.
13, 35516 Münzenberg (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BLÜTTERS-
SAWATZKI, Renate [DE/DE]; Ricarda-Huch-Str. 13,

(54) Title: METHOD FOR SEPARATING CELLS AND BIOMOLECULES USING COUNTER-CURRENT CHROMATOGRAPHY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SEPARATION VON ZELLEN UND BIOMOLEKÜLEN MITTELS GEGENSTROM-CHROMATOGRAPHIE

(57) Abstract: The invention relates to a method for separating cells and biomolecules from mixtures containing said cells and biomolecules. To this end, counter-current chromatography is used with continuous sample delivery and sample drawing using solid, non-porous separation materials. The method is characterised in that only one separating fluid is used so that said separating fluid is not changed, that non-porous separation materials with a modified or non-modified surface are used and that weak affinity interactions are exploited in order to separate the desired cells and biomolecules, the cells to be separated and the biomolecules undergoing said weak affinity interactions with the modified or non-modified surface. The term weak affinity interaction is used to describe those interactions, in which the bonds have a dissociation constant greater than or equal to 10^3 M ($K_d \geq 10^3$ M).

(57) Zusammenfassung: Erfindungsgemäss wird ein Verfahren zur Separation von Zellen und Biomolekülen aus Mischungen bereitgestellt, welche diese Zellen und Biomoleküle enthalten. Dabei wird die Gegenstrom-Chromatographie mit kontinuierlicher Probenaufgabe und -entnahme unter Verwendung von festen, nicht-porösen Trennmateriale eingesetzt. Das erfindungsgemässe Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass nur ein einziges Trennmedium Anwendung findet und somit kein Wechsel des Trennmediums erfolgt, dass nicht poröse Trennmateriale mit einer modifizierten oder nicht modifizierten Oberfläche eingesetzt werden und dass zur Separation der zu separierenden Zellen und Biomoleküle sogenannte schwache Wechselwirkungen ausgenutzt werden, welche die zu separierenden Zellen und Biomoleküle mit der modifizierten oder nicht modifizierten Oberfläche eingehen, wobei unter schwachen Wechselwirkungen solche zu verstehen sind, bei denen die Bindungen eine Dissoziationskonstante von grösser oder gleich 10^3 M ($K_d \geq 10^3$ M) aufweisen.

WO 01/37959 A1

Verfahren zur Separation von Zellen und Biomolekülen mittels Gegenstromchromatographie

BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Separation von Zellen und Biomolekülen aus Mischungen, welche diese Zellen und Biomoleküle enthalten, mittels der kontinuierlichen Gegenstrom-Chromatographie mit
5 kontinuierlicher Probenaufnahme und -entnahme unter Verwendung von festen Trennmaterialien.

Für die Reinigung von biologischen Substanzen bzw. Substanzgemischen wurden bereits zahlreiche chromatographische Verfahren entwickelt. Dazu gehört beispielsweise die HPLC, Anion-
10 Austausch-Chromatographie, Gelfiltration, Affinitätschromatographie und hydrophobe-Matrix-Chromatographie.

Diese Verfahren wurden vorwiegend für analytische Zwecke entwickelt und erfüllen meistens auch die an sie gestellten Anforderungen in hervorragender Weise, nämlich für eine optimale Trennung und eine
15 hohe Auflösung Sorge zu tragen. Allerdings müssen bei diesen Verfahren, bedingt durch das Säulenmaterial, hohe Drücke angewandt oder spezielle Matrices eingesetzt sowie drastische Elutions-Medien zur Anwendung gebracht werden. Insbesondere die häufig erforderlichen Salzkonzentrationen für einige der eingesetzten Elutions-Medien führen
20 zur Problemen in der Praxis, da häufig das Salz aus den Produkten mit energieaufwendigen Verfahren wieder entfernt werden muß.

Werden die beschriebenen Verfahren in der Produktion und insbesondere für die Herstellung von Massengütern eingesetzt, dann spielen jedoch andere Gesichtspunkte und insbesondere wirtschaftliche
25 Aspekte eine wichtige Rolle. Die wichtigsten Faktoren für niedrige Produktionskosten sind moderate Betriebsdrücke, hohe Flußraten, schnelle Elutionen und niedrige Salzlasten.

Für die Produktion im industriellen Maßstab können auch Separationen mit Reinheitsstufen von weniger als 90 % akzeptiert werden, wenn

dadurch die Produktionskosten wesentlich reduziert werden. Für analytische Zwecke sind jedoch Reinheitsstufen größer als 90 % erstrebenswert. Im industriellen Maßstab sind daher insbesondere solche Verfahren von Interesse, die geringe Prozeßkosten nach sich ziehen, auch wenn dies zu Lasten geringerer Trennspezifitäten erfolgt.

Ein weiterer Nachteil der oben beschriebenen chromatographischen Verfahren besteht darin, daß diese meistens chargenweise, d. h. nicht-kontinuierlich, durchgeführt werden. Dies ist im Hinblick auf eine hohe Produktionsleistung nachteilig.

- 10 Zu diesen Verfahren zählen auch solche, die z. B. mit der Affinitätschromatographie arbeiten. Bei diesen bekannten Verfahren werden milde Auftragemedien eingesetzt, aus denen die Substanz, die gewonnen werden soll, durch relativ starke Bindung an das Separationsmedium entfernt wird. Die sich daran anschließende
- 15 selektive Loslösung vom Separationsmedium bedingt dann immer den Einsatz eines relativ drastischen sogenannten Elutionsmediums, mit dessen Hilfe dann die gesuchte Substanz in einem zweiten separaten Schritt gewonnen werden kann. Meist sind solche Elutionsmedien sehr salzreich, und deswegen müssen die gesuchten Substanzen recht
- 20 aufwendig von der Salzlast befreit werden.

- So sind beispielsweise in der DE 19938394 A1 und DE 3930947 A1 Affinitätschromatographie-Verfahren beschrieben, welche die Absorption an Oberflächen nutzen. Dabei werden die zu separierenden Moleküle, wie Antikörper, kovalent und somit mittels starker Bindungen an die
- 25 Separationsoberflächen gebunden. Bedingt durch die starke Anbindung an solche Oberflächen kann die selektive Ablösung der entsprechenden Substanzen nur durch den Einsatz von spezifischen Elutionsmedien erfolgen, wobei die zuvor an den Träger gebundene Substanz durch dieses Elutionsmedium in einem zweiten separaten Schritt abgelöst
- 30 wird. Somit können solche Verfahren nicht für kontinuierliche

Chromatographieverfahren, wie das zuvor beschriebenen Gegenstromverfahren, eingesetzt werden.

Es wurden daher auch bereits kontinuierliche chromatographische Verfahren entwickelt, bei denen das zu chromatographierende Fluid
5 bzw. ein Mehrkomponentengemisch kontinuierlich zugeführt und die getrennten Fraktionen auch kontinuierlich entnommen werden. Teilweise handelt es sich dabei um sogenannte Gegenstromverfahren. Ein Vertreter eines derartigen Gegenstromverfahrens ist beispielsweise das sogenannte Simulated-Moving-Bed-Verfahren (SMB). Derartige
10 Verfahren sind beispielsweise in US-A-2985589 und US-A-3231492 beschrieben. Weiterhin gehört auch das sogenannte True-Moving-Bed-Verfahren (TMB) zu diesen kontinuierlichen Gegenstromverfahren. Dabei wird die zeitabhängige chromatographische Trennung der Säulenchromatographie in eine ortsaufgelöste Trennung umgesetzt.
15 Bezüglich der theoretischen Grundlagen für die SMB-Chromatographie und deren Einsatz im Produktionssektor insbesondere zur Durchführung von Trennungen von optischen Isomeren im großen Maßstab wird verwiesen auf M. Schulte, J.N. Kinkel, R.M. Nicoud und F. Charton in Chem. Ing. Tech. 68(1996), 670-683 „Simulierte
20 Gegenstromchromatographie – eine effiziente Technik zur Herstellung optisch aktiver Verbindungen im industriellen Maßstab“ und in den dort aufgeführten Literaturstellen.

Bei diesem bekannten Gegenstromverfahren werden überwiegend poröse, partikuläre Separationsmedien benutzt. Allerdings sind auch
25 schon für nicht partikuläre Sorbentien solche Verfahren eingesetzt worden, bei denen jedoch immer poröse Materialien eingesetzt wurden, wie das beispielsweise in der WO 9803242 beschrieben ist. So ist es beispielsweise bekannt, als Trennmedium eine poröse Trennmatrix mit definierten Poren für die sogenannte Gelchromatographie einzusetzen.
30 Der verzögernde, die Trennung der Biomoleküle bewirkende Effekt ist

dabei ein unterschiedlicher Fluß der Moleküle durch die Poren oder an den Poren vorbei, je nach Molekülgröße.

Aus biologischen Prozessen kennt man nun das Phänomen der sogenannten schwachen Wechselwirkungen, die insbesondere bei der Zell-Zellerkennung eine wichtige Rolle spielen. Viele Protein-Protein-, Protein-Kohlenhydrat- und Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen sind Beispiele für derartige schwache Wechselwirkungen. Als schwache Wechselwirkungen sind solche, meist für Biomoleküle typische, Bindungen zu verstehen, die nicht kovalenter Natur sind und relativ instabil sind, wie z. B. die bereits bekannten Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe und elektrostatische Bindungen sowie van-der-Waals-sche Kräfte. Die Beschreibung solcher schwachen Wechselwirkungen, wie sie für viele Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen bekannt sind, kann thermodynamisch unter Zuhilfenahme der "heat capacity difference" (ΔC_p), wie bei Cooper beschrieben (A. Cooper, Thermodynamic analysis of biomolecular interactions, Current Opinion in Chemical Biology 1999, 3:557-563) oder wie bei Dunitz (J.D. Dunitz, Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions, Chemistry and Biology 1995, 2:709-712) über die Änderung der freien Energie (ΔG) beschrieben werden. Hierbei werden Bereiche um ca. 5 kcal pro Mol für die Differenz der freien Energie bei schwachen Wechselwirkungen diskutiert. Zur Messung solcher schwachen Wechselwirkungen zwischen Proteinen (Protein-Protein) sind verschiedene Methoden bekannt, wie surface-plasmon-resonance, isothermal titration calorimetry, optische Spektroskopie oder auch Massenspektrometrie, wie bei Lakey und Raggett (J.H. Lakey and E.M. Raggett, Measuring protein-protein interactions, Current Opinion in Structural Biology 1998, 8:119-123) beschrieben. Für die Bestimmung der Bindungskonstanten bei Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen kann z. B. die Methode der Affinitäts-Elektrophorese (P. Tomme et al. Affinity electrophoresis

for the identification and characterization of soluble sugar binding by carbohydrate-binding modules, *Enzyme and Microbial Technology* 2000, 27:453-458) benutzt werden.

- Viele moderne Nachweismethoden für Biomoleküle beruhen auf
- 5 Sensortechniken unter Anwendung schwacher Wechselwirkungen (S. Ohlson et al. Continuous weak-affinity immunosensing, *TIBTECH* 2000, 18:49-52); in dieser zitierten Arbeit wird auch definiert, daß unter schwachen Wechselwirkungen solche zu verstehen sind, deren Dissoziationskonstante K_d im Bereich von 0,10 bis 0,01 mM liegt.
- 10 Schwache Wechselwirkungen als Trennprinzip sind bisher nur bei sogenannten affinitätschromatographischen Verfahren eingesetzt worden (S. Ohlson et al. Weak affinity chromatography of small saccharides with immobilised wheat germ agglutinin and its application to monitoring of carbohydrate transferase activity, *Bioseparation* 1998,
- 15 7: 101-105). Das Prinzip wurde bereits auch in einem Handbuch beschrieben (P. Matejtschuk et al. , Affinity separations of proteins, in: P. Matejtschuk (Ed.) "Affinity separations", IRL-Press, Oxford, 1997, p. 93-94). In allen diesen Arbeiten werden unter schwachen Wechselwirkungen solche Bindungen verstanden bei denen die
- 20 Dissoziationskonstante K_d größer als 10^{-5} M ist.

- Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es demnach, ein Verfahren zur Separation von Zellen und Biomolekülen aus Mischungen, insbesondere aus komplexen Mischungen, mittels der Gegenstrom-Chromatographie mit kontinuierlicher Probenaufgabe und -entnahme unter Verwendung
- 25 von festen nicht-porösen Trennmateriale bereitzustellen, mit dem in den Mischungen enthaltene Zellen und Biomoleküle abgetrennt bzw. separiert werden können, insbesondere für Produktionszwecke und in industriellem Maßstab.

- Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren gemäß der Lehre der
- 30 Ansprüche.

Ein Kernelement des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß man die im Rahmen der vorliegenden Unterlagen beschriebenen schwachen Wechselwirkungen ausnutzt. Zur Definition dieser schwachen Wechselwirkungen wird die oben diskutierte

5 Dissoziationskonstante K_d , die erfindungsgemäß größer oder gleich 10^{-5} M ist, eingesetzt. Diese Definition dient somit im Rahmen der Erfindung zur Charakterisierung von schwachen Wechselwirkungen.

Es muß jedoch ausdrücklich festgehalten werden, daß die zuvor beschriebenen Techniken der Anwendung schwacher Wechselwirkung

10 zur Separationszwecken bisher lediglich für analytische Verfahren beschrieben worden sind und diese Technik für präparative Verfahren oder gar im industriellen Maßstab bisher keinerlei Verwendung fanden.

Anders ausgedrückt bedeutet dies, daß beim erfindungsgemäßen Verfahren eine reversible Adsorption an modifizierten und nicht-

15 modifizierten Oberflächen auf festen nicht-porösen Trennmaterialein unter Ausnutzung der schwachen Wechselwirkungen stattfindet.

Auch für Zellen sind solche schwachen Wechselwirkungen beschrieben; so z. B. bei dem verzögerten Rollen von Blutzellen an Blutgefäßwänden. Hierfür werden als vermittelnde Moleküle sogenannte Selektine

20 verantwortlich gemacht. Eine nähere Beschreibung dieses Vorganges ist bei Lawrence (M.B. Lawrence, Selectin-carbohydrate interactions in shear flow, Current Opinion in Chemical Biology 1999, 3:659-664) zu finden. Genau die gleichen Wechselwirkungen sollen Grundlage für das hier beschriebene Trennprinzip darstellen: die Zellen werden beim Fluß

25 durch die Separationseinheiten an deren Oberfläche durch spezifische Moleküle festgehalten, jedoch nicht fest gebunden und können deswegen verzögert weiter fließen. Diese selektive (biospezifische) Verzögerung bestimmter Zellen im Fluß durch kurzzeitige schwache Anbindung an spezifische Moleküle der Trennoberflächen und die

30 Wiederablösung stellen das beschriebene Trennprinzip dar.

Unter schwachen Wechselwirkungen werden dabei insbesondere solche verstanden, die den Wechselwirkungen der Zell-Zell-Erkennung, der Protein-Protein-Wechselwirkung, der Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkung und der Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkung zugrunde liegen und deren Dissoziationskonstante K_d größer als oder gleich 10^{-6} M ist.

Im Gegensatz zu den eingangs beschriebenen, bekannten Chromatographieverfahren, die chargenweise und deswegen nicht kontinuierlich durchgeführt werden, handelt es sich beim erfindungsgemäßen Verfahren um ein kontinuierliches Verfahren bzw. um einen kontinuierlichen Prozess, das bzw. der nach dem Gegenstromverfahren arbeitet, wobei nur ein einziges flüssiges Trennmedium eingesetzt wird.

Durch die Anwendung der erfindungsgemäß ausgenutzten schwachen Wechselwirkungen ist es somit erstmals möglich, kontinuierliche Prozesse mit Gegenstromverfahren zu benutzen, da hierbei immer nur ein einziges Trennmedium benutzt wird, wobei im einfachsten Fall sogar der Rohstoff in seiner natürlichen Form (z. B. Fermentationsüberstand) direkt und ohne Zusatz von Salzen dem Chromatographieverfahren zugeführt werden kann. Da keine starke Anbindung von Substanzen an das Separationsmedium erfolgt, benötigt ein solcher Prozess auch keine besonderen Elutionsmedien und kann somit als kontinuierlicher Prozess ausgeführt werden.

Erst die Anwendung der schwachen Wechselwirkungen und damit der Verzicht auf ein separates Elutionsmedium ermöglichen einen kontinuierlichen Prozeß, da das Trennmedium nicht gewechselt werden muß.

Ein weiteres wesentliches Element des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß im Gegensatz zum Stand der Technik keine porösen Trennmateriale Anwendung finden. Mit anderen Worten, es werden

- 5 somit Trennmaterien mit einer undurchlässigen und nicht porösen Oberfläche eingesetzt. Unter nicht porösen Trennmaterien (non-porous supports) werden solche Materialien verstanden, wie sie teilweise bereits bei Materialien wie Nylon, Polystyrol, Silikat-Glas
- 10 (A.L.Plant et al., Immobilization of binding proteins on nonporous supports. Comparison of protein loading, activity, and stability, Appl Biochem Biotechnol 1991, 30:83-98), 1,5 micrometer Kieselgel (P.D. Angus et al., Evaluation of 1.5 microm reversed phase nonporous silica in packed capillary electrochromatography and application in
- 15 pharmaceutical analysis, Electrophoresis 1999, 20:2349-59), modifizierten Kieselgelen (F.B. Anspach et al. High-performance liquid affinity chromatography with phenylboronic acid, benzamidine, tri-alanine, and concanavalin A immobilized on 3-isothiocyanatopropyltriethoxysilane-activated nonporous monodisperse
- 20 silicas, Anal Biochem 1989, 179:171-81), alkylierten Styrol-Divinylbenzol-Copolymeren (C.G. Huber et al., High-resolution liquid chromatography of oligonucleotides on nonporous alkylated styrene-divinylbenzene copolymers, Anal Biochem 1993, 212:351-8), oder Agarose (J.P. Li ,Hjerten, S. High-performance liquid chromatography of
- 25 proteins on deformed nonporous agarose beads: immuno-affinity chromatography, exemplified with human growth hormone as ligand and a combination of ethylene glycol and salt for desorption of the antibodies, J Biochem Biophys Methods 1991, 22:311-22) beschrieben sind. Für nicht-partikuläre, nicht-poröse Trennmaterien gibt es nur wenige
- 30 Beispiele, wie z. B. Quarz-Fasern (P. Wikstrom. Larsson P.O., Affinity fibre – a new support for rapid enzyme purification by high-performance liquid affinity chromatography, J Chromatogr 1987, 388:123-34). Alle diese Materialien auch in ihrer nicht porösen Form wurden jedoch bisher weder für kontinuierliche Chromatographieverfahren noch für industrielle
- Prozesse eingesetzt. Die beschriebenen Anwendungen bezogen sich auch nicht auf Separationen, bei denen sogenannte schwache Wechselwirkungen als Trennprinzip eingesetzt wurden.

- Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird somit nicht der bereits bekannte verzögernde Effekt auf Grund von Diffusionsvorgängen, der bei porösen Materialien beobachtet werden kann, sondern ein völlig anderes Prinzip ausgenutzt. Zusätzlich ist bei dem erfindungsgemäßen
- 5 Verfahren zur Trennung der Moleküle ein verzögernder Effekt notwendig. Dieser wird jedoch durch die zuvor näher beschriebenen schwachen Wechselwirkungen erreicht, welche die zu trennenden Moleküle mit den Oberflächen der nicht porösen Trennmaterien eingehehen.
- 10 Erfindungsgemäß können nun die Oberflächen entweder modifiziert oder nicht modifiziert sein. Durch die entsprechende Auswahl der Oberflächen oder deren Modifizierung wird erreicht, daß die entsprechenden zu trennenden Moleküle durch molekulare Anhaftungseffekte an den entsprechenden Oberflächen zurückgehalten
- 15 werden, wodurch eine Trennung der Moleküle erfolgt. Das Ausmaß der Trennung kann durch die Dichte der entsprechenden molekularen Anhaftungsstellen beeinflußt werden.

- Dieser Trenneffekt mag zwar für eine übliche, chargenweise durchzuführende Chromatographie nicht immer ausreichend sein. Dabei
- 20 ist jedoch zu berücksichtigen, daß es sich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren um ein Gegenstrom-Chromatographieverfahren handelt, das eben in der Lage ist, die gewünschte Trennung zu erreichen.

- Das erfindungsgemäße Verfahren, das die geschilderten schwachen Wechselwirkungen ausnutzt, hat den Vorteil, daß die Trennung der
- 25 Biomoleküle ohne Anwendung drastischer Maßnahmen, beispielsweise hohe Salzkonzentrationen, erfolgen kann. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren können somit hohe Druckdifferenzen vermieden werden, so daß auch eine Trennung von Zellen aus biologischen Matrices erreicht werden kann. Die Trennung erfolgt dabei – wie geschildert –

grundsätzlich an Oberflächen, die an nicht porösen Matrices oder porösen Membranen ausgebildet sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann insbesondere zum großtechnischen Trennen von Biomolekülen und Zellen benutzt werden.

- 5 Als Biomoleküle können beispielsweise Proteine, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren, Glycoproteine, Glycolipide, Vitamine, Enzyme, Lipide, und bioaktive Stoffe eingesetzt werden. Als bioaktive Stoffe kommen insbesondere Hormone und Phytoöstrogene in Frage. Als Zellen werden vorzugsweise solche aus pflanzlichen, tierischen oder
- 10 einzelligen Zellquellen oder aus peripherem Blut eingesetzt. Für jeweils bestimmte Moleküle dieser Stoffklassen kann es gegebenenfalls erforderlich sein, verschiedene Trennmatrices einzusetzen. Dabei erfolgt die Auswahl der Trennmateriale in der Weise, daß die schwachen Wechselwirkungen ausreichen, um die Stoffe voneinander zu trennen,
- 15 ohne daß sie dauerhaft an den Oberflächen haften bleiben. Dazu wird vorzugsweise die Dichte der trennaktiven Oberflächenkomponenten bzw. Anhaftungsstellen derart eingestellt, daß keine Zusätze von Salzen zur Trennung benötigt werden.

- Bezüglich der Trennung von Zellen ist das erfindungsgemäße Verfahren
- 20 primär für die Separation von peripheren Stammzellen aus dem Blut von humanen Spendern gedacht. Dabei wird das Blut vorzugsweise direkt in eine nachstehend noch näher beschriebene Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingeleitet, während die in Frage kommenden Zellen an den entsprechenden Oberflächen
- 25 derart retardiert werden, daß die Stammzellen kontinuierlich aus der Vorrichtung entnommen werden können, während die übrigen Blutkomponenten im wesentlichen unverändert an anderen Stellen der Vorrichtung entnommen werden können.

- Weiterhin werden als Zellen vorzugsweise solche eingesetzt, die aus
- 30 Fermentationen gewonnen werden können. Dabei kann es sich um

- pflanzliche, tierische oder einzellige Organismen handeln. Erfindungsgemäß werden in erster Linie Biomoleküle und somit solche Moleküle, die aus biologischen Quellen stammen, für die industriellen Trennprozesse berücksichtigt. Diese Biomoleküle stellen wichtige
- 5 Ausgangsprodukte für die pharmazeutische Industrie und für die Lebensmittelindustrie dar. Als zu chromatographierende Flüssigkeit bzw. als Mehrkomponentengemisch werden erfindungsgemäß daher vorzugsweise Tiermilchen und Molkereiprodukte, Fermentations-Überstände, Melasse, Pflanzenextrakte, Rückstände aus der
- 10 Pflanzenverarbeitung, Blutprodukte, Waschwässer aus Industrieproduktionen und Industrierückstände eingesetzt. Allen diesen Quellen ist gemeinsam, daß sie eine Vielfalt von Biomolekülen enthalten, von denen einzelne, insbesondere dann, wenn sie in gereinigter Form vorliegen, ausgesprochen interessant für die weitere
- 15 wirtschaftliche Nutzung sind. Die derzeit eingesetzten Trennprozesse für derartige Moleküle sind derart teuer, daß sie insbesondere für die Massenproduktion wie beispielsweise im Lebensmittelbereich unwirtschaftlich sind.

- Wie bereits oben dargelegt, können die zur Anwendung gebrachten
- 20 Trennmaterien unmodifizierte und auch modifizierte Oberflächen aufweisen. Die Modifizierung von Oberflächen ist an sich bekannt und wird für die Trennung unter Einsatz poröser, partikulärer Trennmedien oder unter Einsatz von porösen Membranen benutzt. Im Gegensatz zum Stand der Technik wird jedoch erfindungsgemäß nicht an der Oberfläche
- 25 von porösen Trennmaterien, sondern an der Oberfläche von nicht porösen Materialien durchgeführt. Als Trennmaterien mit einer unmodifizierten Oberfläche werden vorzugsweise biologische Polymere eingesetzt. Dazu zählen vorzugsweise Cellulosen, Chitosane, Dextrane, Dextrine, Cyclodextrine, Stärken, Agarosen, Poly-L-Leucin und Poly-DL-
- 30 Methionin. Es sei noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen, daß bei den zur Anwendung gebrachten Oberflächen keine Poren vorhanden

sind, durch die der Flüssigkeitsstrom mit den darin vorhandenen Molekülen fließen kann.

- Ferner werden vorzugsweise modifizierte biologische Polymere als Trennmaterialien eingesetzt. Dazu zählen vorzugsweise modifizierte
- 5 Cellulosen wie Celluloseacetate, Carboxymethylcellulose, Celluloseacetat-butyrat, Ethylcellulose, Celluphan sowie andere Celluloseester und -mischester. Ferner werden als Trennmaterialien modifizierte und unmodifizierte Kunststoffe zur Anwendung gebracht. Dabei handelt es sich vorzugsweise um folgende: Polyethylen,
- 10 Polysulfone, Polyethersulfone, Polyamide, Nylone, PVC(Polyvinylchlorid), Polyacrylnitril, Polyaramid, Polystyrole einschließlich Styrol/Divinylbenzol-Polymere, Polyester, Polypropylene, Teflone, PTFE, FEP, PFA, Polyvinylalkohole, Polyvinylidenfluorid, Polyvinylidendifluoride, Polyolefine, Methacrylpolymere, Polybenzimidazol,
- 15 Polyfuran, Polyphenylenoxid, Polyethylenimin, Polyacrylate, Polybutadiene, Polybenzimidazolone, Polyether-/amid, Polyether-/harnstoff, Polyether-viscose, Polydimethylsiloxan, Silicon, Siloxane, Polycarbonat, Polyalkylsulfon, Polyisopren, Polyethylenterephthalat und Mischungen aus zwei oder mehreren dieser Kunststoffe.
- 20 Ferner werden vorzugsweise modifizierte und unmodifizierte anorganische Matrices eingesetzt, wobei es sich insbesondere um biokompatible Werkstoffe wie Kohlenstoff/Kohlefaser-Verbundstoffe, Keramiken (TiO_2 , Al_2O_3 , ZrSiO_4 , ZrO_2), Silikate, Gläser und andere Matrices (wie z.B. Gewebe aus Metalldraht oder Glasfaser mit oder ohne
- 25 Oberflächenmodifikation), die für den chemischen Apparatebau typisch sind, handelt. Auch hierbei ist zu berücksichtigen, daß die zu trennenden Biomoleküle und Zellen nicht durch oder in die Oberflächen penetrieren, um auf diese Weise die Möglichkeit von unkontrollierten Absorptionen und ungewollten Druckabfällen zu vermeiden.

Die Modifikation der Trennmateriale (genauer der Oberflächen davon) kann unter Einsatz per se bekannter Verfahren durchgeführt werden. Solche Modifikationen sind u. a. in DE 1980 54 31 A1 beschrieben, wobei ebenso und poröse und auch nicht partikulärer Trennmateriale

5 benutzt werden. Das dort beschriebene Verfahren hat jedoch eindeutig das Ziel, Affinitätsliganden zum Zweck der Affinitätschromatographie herzustellen, wobei es sich um solche Liganden handelt, die Nukleinsäuren fest binden und aus dem Medium durch Bindung an diesen Träger entfernen. Liganden, die lediglich schwache

10 Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren eingehen und damit nur eine Verzögerung im Laufmittel bewirken, wie es Gegenstand des Prinzips der schwachen Wechselwirkungen ist, werden in DE 1980 54 31 A1 jedoch nicht benutzt.

Zu den möglichen Verfahren der Modifikation zählt vorzugsweise die

15 chemische Verknüpfung (cross-linking). Dabei werden vorhandene Gruppen auf den Polymeren, beispielsweise Hydroxyl-, Carboxy-, Carboxyl-, Amino-, Amid-, Aryl-, Sulfhydryl-, Alkyl-, Methoxy- und Ethoxy-Reste, bzw. -Gruppen nach an sich bekannten Verfahren aktiviert, wie sie beispielsweise beschrieben sind in:

20 E. Müller, E. Klein „Membranes Modified for Biochromatography“ in: Bioseparation und Bioprocessing. Vol 1 (Herausgeber: G. Subramanian), Wiley-VCH, Weinheim 1997. Nach der Aktivierung werden dann die erforderlichen Liganden kovalent an die Oberflächen gebunden. Zu den erfindungsgemäß einsetzbaren Aktivierungsmethoden gehören

25 beispielsweise Verfahren, bei denen folgende Aktivierungsreagenzien Anwendung finden: Cyanogen-Bromid, Tosyl-Chlorid, N-Hydroxy-Succinimid, Carbonyl-di-Imidazol, Carbodiimide, 1,4-Butandiol-diglycidol-Ether, Glutaraldehyd und 2-Fluoro-1-Methylpyridin. Gewünschtenfalls können sogenannte spacer eingeführt werden. Als

30 Anhaftungsstellen bzw. Bindungsstellen für die schwachen Wechselwirkungen können dann an die so aktivierten Oberflächen

vorzugsweise folgende Biomoleküle gebunden werden: polymere Kohlenhydrate (z. B. Chitosane und Dextrane), Glycoproteine, Glycopeptide, Glycane, Lektine, polymerisierte Aminosäuren (beispielsweise Poly-L-Leucin), Peptide, Proteine, Nukleotide und
5 Biomoleküle-bindende Farbstoffe.

Die Geometrie der Oberflächen der Trennmaterien, an denen die Separation erfolgt, kann ausgesprochen vielfältig ausgeführt sein. Die Trennmaterien werden dabei von der zu chromatographierenden Flüssigkeit umspült oder durchspült. So können z. B. glatte Flächen in
10 möglichst geringen Abständen in Form von schmalen Kanälen oder Röhren eingesetzt werden. Auch können flexible Schläuche mit geringen Durchmessern eingesetzt werden. Um die Abstände auf einem definierten Maß halten zu können, werden vorzugsweise sogenannte Abstandhalter in Form von Fäden, Netzen oder Präzisionsgeweben
15 zwischen den Flächen eingefügt. Diese Abstandhalter können aus dem gleichen Material wie die Oberflächen der Trennmaterien bestehen. Ferner können auch Röhren, Schläuche oder Wickeleinheiten aus einem inerten Material benutzt werden, in deren Lumen sich Fäden, Netze oder dochartige Gewebe befinden, deren Oberfläche wie zuvor beschrieben
20 beschaffen sind. Weiterhin können unregelmäßige Filterformen, wie Metallschmelzefilter (z.B. der Fa. Drache, Dietz, BRD) eingesetzt werden, die eine große Oberfläche aufweisen und aus keramischen, chemisch und termisch hochbeanspruchbaren, Material gefertigt sind. Die Flüssigkeitsströme laufen dabei an diesen Oberflächen vorbei und
25 durchdringen sie nicht. Da die Flüssigkeitsströme somit auf keine großen Widerstände stoßen, können große Druckabfälle vermieden werden. Somit können auch Pumpen und Ventile eingesetzt werden, die für mittlere Druckverhältnisse ausreichend und auch kostengünstiger sind, als das für Hochdruck-Apparaturen der Fall ist.

30 Die Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist mit mehreren sogenannten Separationseinheiten versehen, in denen

sich die Trennmaterialien befinden. Die Separationseinheiten sind zumindest chromatographisch im wesentlichen gleich ausgestaltet und vorzugsweise im wesentlichen identisch. Vorzugsweise sind die eingesetzten Trennmaterialien hinsichtlich Form, Größe und Art in etwa
5 die gleichen und vorzugsweise im wesentlichen identisch. Vorzugsweise sind mehrere Separationseinheiten flußmäßig hintereinander geschaltet und zu Trennzonen zusammengefaßt.

Der Zufluß und Abfluß sowohl der Eintrag und Austrag geschieht mittels Ventileinheiten, die durch einen Computer gesteuert werden und deren
10 Stellung anhand eines mathematischen Modells verändert werden, so daß der an sich schwache, auf den Wechselwirkungen beruhende Trenneffekt derart optimiert wird, daß die Trennung der Substanzen kontinuierlich erfolgen kann. Das Ein- und Austragen der Stoffflüsse erfolgt mit Hilfe von mehreren und typischerweise vier Pumpen. Das
15 Fluß- und Kreislaufsystem, das von einer weiteren Pumpe aufrechterhalten wird, ist dabei wie bei der SMB-Chromatographie gestaltet. Es gibt somit mehrere Trennzonen, denen jeweils eine bestimmte Anzahl von Separationseinheiten zugeordnet sind und die an die entsprechenden Leitungen durch Ventilschaltungen angekoppelt
20 sind.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden normalerweise nicht reine Zweistoffgemische aufgetrennt, wie das bei der Simulated-Moving-Bed-Chromatographie üblich ist. Vielmehr werden erfindungsgemäß komplexere Gemische von Biomolekülen eingesetzt, bei denen jedoch
25 meistens eine Trennung in zwei Komponenten ausreichend ist. Durch die Wiederholung der Trennung in zwei Komponenten ist letztendlich ebenso eine Reindarstellung einzelner Biomoleküle möglich, sofern dies gewünscht wird. Dabei sind in diesem Fall unter Komponenten komplexere Mischungen zu verstehen.

Die Ausgestaltung und Steuerung der Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist im übrigen bekannt. Derartige Vorrichtungen werden auch bei der SMB-Chromatographie und der TMB-Chromatographie eingesetzt. Allerdings arbeiten diese bekannten
5 Vorrichtungen mit porösen Trennmaterien, wie dies oben geschildert ist. Das erfindungsgemäße Trennverfahren, welches sich der genannten schwachen Wechselwirkung bedient und bei dem die Trennung an nicht porösen Oberflächen erfolgt, kann auch als computergesteuerte Gegenstrom-Chromatographie durch Trennung an Oberflächen oder auf
10 englisch „computer controlled counter current chromatography using separation on surfaces“ oder abgekürzt „C-5-S-2“ bezeichnet werden. Nachstehend wird nur noch der Begriff „C-5-S-2“ verwendet.

Dieses C-5-S-2-Verfahren wird anhand der Abb. 1 nachstehend näher beschrieben. Die Abb. 1 gibt den Aufbau einer Vorrichtung zur
15 Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens stark vereinfacht sowie sehr schematisiert wieder, wobei zahlreiche Details weggelassen sind, um das Prinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens klarer und einfacher darstellen zu können. Der dort gezeigte Aufbau und die Steuerung ist jedoch – wie dargestellt – bekannter Art. Diesbezüglich
20 wird auf die weiter vorne erwähnten Druckschriften verwiesen.

Die einzelnen Separationseinheiten A, B, C, D, E, F, G und H der in der Abb. 1 gezeigten Vorrichtung sind flußmäßig hintereinander geschaltet. Zwischen diesen einzelnen Separationseinheiten befinden sich Zu- und Abflüsse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 zu einer großen Ventileinheit 10. Die
25 Zu- und Abflüsse 1 bis 8 weisen jeweils einen Zufluß und einen Abfluß auf; der Einfachheit halber sind die beiden Leitungen nur mit einem Strich 1 bis 8 in der Abbildung dargestellt. An den Mündungen 11 bis 18 dieser Zu- und Abflüsse 1 bis 8 in die Zirkulationsleitung 19 sind jeweils Dreiwegeventile angeordnet, die nicht dargestellt sind. Die Ventileinheit
30 10 ist computergesteuert und mit zwei Zuflüssen 21 und 22 und zwei Abflüssen 23 und 24 ausgestattet, wobei jeweils ein Zufluß 21 für das

Trennmedium und ein Zufluß 22 für das zu trennende Gemisch und ein Abfluß 23 für die Komponente 1 und ein Abfluß 24 für die Komponente 2 vorhanden sind.

Bei der in der Abb. 1 gezeigten Ausführungsform sind jeweils zwei
5 Separationseinheiten A, B; C, D; E, F und G, H zu Trennzonen AB, CD, EF und GH zusammengeschaltet. Die Zu- und Abflüsse sind dabei derart durch die Ventilanordnung geschaltet, daß immer ein Zufluß und Abfluß sich abwechseln. So befindet sich die erste Trennzone AB zwischen dem Zufluß des Trennmediums und dem Abfluß der Komponente 2
10 (Extrakt). Die zweite Trennzone CD befindet sich zwischen dem Abfluß der Komponente 2 (Extrakt) und dem Zufluß des zu trennenden Gemisches. Die dritte Zone EF befindet sich hier zwischen der Zufuhr des zu trennenden Gemisches und dem Abfluß der Komponente 1 (Raffinat). Die vierte Zone GH befindet sich zwischen dem Abfluß der
15 Komponente 1 (Raffinat) und dem Zufluß des Trennmediums. Wie dargelegt, sind somit jeweils zwei Separationseinheiten zu einer Trennzone zusammengeschaltet. Diese Art der Schaltung stellt jedoch nur eine Ausführungsform dar. Selbstverständlich können die Separationseinheiten auch alleine eingesetzt oder zu dreien, vierten etc.
20 zusammengeschaltet sein.

Die zentrale Vierfach-Verteiler-Ventil-Einheit 10 wird mithilfe eines Computerprogrammes gesteuert und kann mechanisch unterschiedlich aufgebaut sein. Sie kann beispielsweise als ein Rotationsvielfachventil ausgestaltet oder aus mehreren Dreifach- oder Einfachventilen
25 aufgebaut sein. Entscheidend ist nur, daß die Ventile derart geöffnet und geschlossen werden, daß die Trennzonen AB, CD, EF und GH derart in Fließrichtung der mobilen bzw. flüssigen Phase weitergeschaltet werden, daß ein quasi Gegenstrom zur Festphase erzeugt wird. Die Pumpen werden dabei vorzugsweise derart von einem
30 Computerprogramm gesteuert, daß die Flußraten in den Trennzonen so geregelt werden, daß an den Ausflüssen jeweils ausschließlich die

- reinen Komponenten 1 und 2 ausgetragen werden. Es handelt sich dabei um einen komplex geregelten Prozeß, bei dem die geeigneten Parameter zweckmäßigerweise durch Computersimulation ermittelt werden. Dabei können die mathematischen Grundlagen zur Anwendung
- 5 kommen, die bereits für die Simulated-Moving-Bed-Chromatographie entwickelt worden sind, nämlich: Gottschlich, N. et al., J. Chromatogr. 719, 267-274 (1994); Zong, G. et al. AIChEJ. 43,2960-2969 (1997); Zong, G. and Guiochon, G. Chem. Eng. Sci. 52,4403-4418 (1997); Yun, T. et al. AIChEJ 43,2970-2983 (1997).
- 10 Das erfindungsgemäße Verfahren wird anhand der folgenden, bevorzugte Ausführungsformen beschreibenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1:

Separation von peripheren Stammzellen aus dem Blut eines Spenders

Mit Hilfe des C-5-S-2-Verfahrens wird aus dem Blut eines Spenders direkt eine Stammzellen-Separation kontinuierlich durchgeführt. Dazu
5 werden die Separationseinheiten wie folgt hergestellt:

Teflon-Schläuche von 8 mm im Durchmesser werden auf einer Länge von 40 Zentimetern an den Enden mit Edelstahl-Netzen abgeschlossen, und die verjüngten Enden werden jeweils mit dünneren Schläuchen mit Pumpen bzw. Ventilen verbunden. Zwischen den Enden wird als
10 Trennmaterial ein dochtartiges Nylongewebe eingebracht, auf dem durch Aktivierung mit Cyanurchlorid und Dicyclohexylcarbodiimid das Glycan Sialyl-Lewis-A als Anhaftungsphase gekoppelt ist. Dabei wurde die Gruppendichte so gewählt, daß weniger als 0,1 μMol des Liganden pro Gramm Nylon gebunden ist. Jeweils ein solches Teflonschlauchstück
15 stellt eine Separationseinheit dar. Insgesamt werden 8 Separationseinheiten hinter einander geschaltet, wobei die Trennzonen jeweils aus 2,2,3,1 Einheiten bestehen. Trennzone 1 (Trennmedium/Stammzellen-Extrakt) besteht aus 2 Einheiten. Trennzone 2 (Stammzellen-Extrakt/Blutzufluß) besteht aus 2 Einheiten. Trennzone
20 3 (Blutzufluß/Blutabfluß) besteht aus 3 Einheiten. Trennzone 4 (Blutabfluß/Trennmedium) besteht aus 1 Einheit. Als Trennmedium wird isotone Kochsalzlösung benutzt. Die gesamte Apparatur wird auf 37 Grad Celsius temperiert.

Auf diese Weise ist es möglich, innerhalb von 2 Stunden etwa 10
25 Millionen Stammzellen aus dem peripheren Blut eines Spenders zu gewinnen.

Beispiel 2:

Separation von Lactoferrin aus Kuh-Molke

- Mit Hilfe des C-5-S-2-Verfahrens wird Lactoferrin aus Kuhmolke
- 5 separiert. Dazu werden die Separationseinheiten wie folgt hergestellt. In Schläuche von 50 mm Durchmesser aus Celluloseacetat werden Spacer (Netze aus gewobenen Celluloseacetat Fasern von 0,5 mm Durchmesser) eingelegt und in Längen von 3 m flach auf Kerne aufgewickelt. Die Schläuche sind nicht porös, und die Enden werden
- 10 jeweils mit Kunststoffritten abgeschlossen und verjüngt, damit die entsprechenden Zuflußschläuche und Abflußschläuche an die Einheiten angeschlossen werden können. Die Celluloseacetat-Oberflächen werden mit Hilfe von 1,1 Carbonylimidazol aktiviert und Chitosane daran
- 15 kovalent gebunden. Die Gruppendichte beträgt ca. 1,0 mMol pro Gramm Celluloseacetat. Es werden 10 Separationseinheiten hintereinander geschaltet wobei eine Anordnung 1,4,4,1 benutzt wird. Dabei ist Trennzone 1 (Trennmedium/Lactoferrin-Abfluß) 1 Einheit, Trennzone 2 (Lactoferrin-Abfluß/Zufluß-Molke) 4 Einheiten, Trennzone 3 (Zufluß-Molke/Abfluß-Restmolke) 4 Einheiten und Trennzone 4 (Abfluß-
- 20 Restmolke/Trennmedium) 1 Einheit groß.

Als Trennmedium wird 10 mM Kochsalzlösung benutzt. Auf diese Weise ist es möglich, kontinuierlich pro Stunde zwischen 10 und 30 Kilogramm Lactoferrin herzustellen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Separation von Zellen und Biomolekülen aus Mischungen, welche diese Zellen und Biomoleküle enthalten, mittels der Gegenstrom-Chromatographie mit kontinuierlicher
5 Probenaufgabe und -entnahme unter Verwendung von festen Trennmaterialien,
dadurch gekennzeichnet,
dass nur ein einziges Trennmedium Anwendung findet und somit kein Wechsel des Trennmediums erfolgt,
10 dass nicht poröse Trennmaterialien mit einer modifizierten oder nicht modifizierten Oberfläche eingesetzt werden und
dass zur Separation der zu separierenden Zellen und Biomoleküle sogenannte schwache Wechselwirkungen ausgenutzt werden,
welche die zu separierenden Zellen und Biomoleküle mit der
15 modifizierten oder nicht modifizierten Oberfläche eingehen, wobei unter schwachen Wechselwirkungen solche zu verstehen sind, bei denen die Bindungen eine Dissoziationskonstante von größer oder gleich 10^{-5} M ($K_d \geq 10^{-5}$ M) aufweisen.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
20 dadurch gekennzeichnet,
dass schwache Wechselwirkungen ausgenutzt werden, die der Zell-Zell-Erkennung zu Grunde liegen bzw. der Protein-Protein-Wechselwirkung, der Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkung oder der Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkung entsprechen.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass als Biomoleküle Proteine, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren, Glycoproteine, Glycolipide, Vitamine, Enzyme, Lipide, und bioaktive
Stoffe und als Zellen solche aus pflanzlichen, tierischen oder
30 einzelligen Zellquellen oder aus peripherem Blut eingesetzt werden.

4. Verfahren nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass als bioaktive Stoffe Hormone, als Zellen solche aus der
Fermentation und als peripheres Blut solches vom Menschen
eingesetzt wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass als Trennmaterialien biologische Polymere, modifizierte
biologische Polymere, modifizierte oder unmodifizierte Kunststoffe,
modifizierte oder unmodifizierte anorganische Matrices eingesetzt
werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass als biologischen Polymere Cellulosen, Chitosane, Dextrane,
Dextrine, Cyclodextrine, Stärken, Agarosen, Poly-L-Leucin und
Poly-DL-Methionin,
als modifizierte biologische Polymere modifizierte Cellulosen wie
Celluloseacetate, Carboxymethylcellulose, Celluloseacetat-butyrat,
Ethylcellulose, Celluphan sowie andere Celluloseester und -
mischester,
als modifizierte und unmodifizierte Kunststoffe Polyethylen,
Polysulfone, Polyethersulfone, Polyamide, Nylone,
PVC(Polyvinylchlorid), Polyacrylnitril, Polyamid, Polystyrole
einschließlich Styrol/Divinylbenzol-Polymere, Polyester,
Polypropylene, Teflone, PTFE, FEP, PFA, Polyvinylalkohole,
Polyvinylidenfluorid, Polyvinylidfluoride, Polyolefine,
Methacrylpolymere, Polybenzimidazol, Polyfuran,
Polyphenylenoxid, Polyethylenimin, Polyacrylate, Polybutadiene,
Polybenzimidazol, Polyether-/amid, Polyether-/harnstoff,
Polyether-viscose, Polydimethylsiloxan, Silicon, Siloxane,
Polycarbonat, Polyalkylsulfon, Polyisopren, Polyethylenterephthalat

- und deren Mischungen und
als modifizierte und unmodifizierte anorganischen Matrices
Kohlenstoff/Kohlefaser-Verbundstoffe, Keramiken (z.B.: TiO_2 , Al_2O_3 ,
ZrSiO₄, ZrO₂), Silikate, Gläser und andere Matrices (wie z.B.:
5 Metall- oder Glasgeflechte mit/ohne modifizierter Oberfläche), die
für den chemischen Apparatebau typisch sind, eingesetzt werden.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass Trennmaterialien mit einer modifizierten Oberfläche eingesetzt
10 werden, wobei die Modifikation nach per se sich bekannten
Verfahren der chemischen Verknüpfung (cross-linking) durchgeführt
wurde und die auf der zu modifizierenden Oberfläche vorhandenen
Gruppen mit an sich bekannten Aktivierungsreagenzien aktiviert
wurden und an die so aktivierten Oberflächen Moleküle aus der
15 Gruppe der polymeren Kohlenhydrate, der Glycoproteine, der
Glycopeptide, der Glycane, der Lektine, der polymerisierten
Aminosäuren, der Peptide, der Proteine, der Nukleotide oder der
Biomoleküle-bindenden Farbstoffe gebunden wurden.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
20 dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei den vorhandenen Gruppen um Hydroxyl-,
Carboxy-, Carboxyl-, Amino-, Amid-, Aryl-, Sulfhydryl-, Alkyl-,
Methoxy- und Ethoxy- Gruppen, bei den Aktivierungsreagenzien um
Cyanogen-Bromid, Tosyl-Chlorid, N-Hydroxy-Succinimid, Carbonyl-
25 di-Imidazol, Carbodiimide, 1,4-Butandiol-diglycidol-Ether,
Glutaraldehyd, 2-Fluoro-1-Methylpyridin), bei den anzulagernden
Molekülen in Form der polymeren Kohlenhydraten um Chitose
und Dextrane und bei den anzulagernden Molekülen in Form von
polymerisierten Aminosäuren um Poly-L-Leucin handelt.

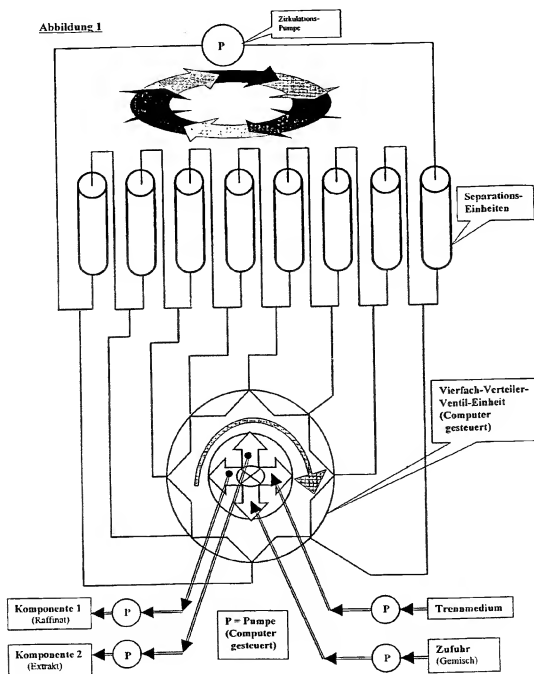
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Trennmaterialien mit der modifizierten oder nicht
modifizierten Oberfläche in Separationseinheiten eingesetzt sind,
5 von der zu chromatographierenden Flüssigkeit umspült oder
durchspült werden und einerseits als Kanäle, Röhren, flexible
Schläuche oder Wickeleinheiten ausgebildet sind, wobei
Abstandhalter aus dem gleichen Trennmaterial in Form von Fäden,
Netzen, Geweben oder dochtartigen Geweben darin eingesetzt sein
10 können, oder andererseits in das Lumen von Röhren, Kanälen,
Schläuchen oder Wickeleinheiten aus einem inerten Material als
Fäden, Netze, Gewebe oder dochtartige Gewebe, sowie regellose
Strukturen z.B. aus keramischen Werkstoffen eingesetzt sind.
10. Verfahren nach Anspruch 9,
15 dadurch gekennzeichnet,
dass die Separationseinheiten zumindest im wesentlichen gleich
ausgestaltet sind.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet,
20 dass mehrere Separationseinheiten flußmäßig hintereinander
geschaltet sind und zu Trennzonen zusammengeschaltet sind.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass solche Biomoleküle an den Oberflächen der Trennmaterialien
25 gebunden sind, die mit Blutzellen und periphere Stammzellen in der
zu chromatographierenden Flüssigkeit in Wechselwirkung treten
können.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
30 dass als zu chromatographierende Flüssigkeit Tierrmilchen,

Fermentations-Überstände, Melasse, Pflanzenextrakte, Rückstände aus der Pflanzenverarbeitung, Blutprodukte, Waschwässer aus Industrieproduktionen und Industrierückstände eingesetzt werden.

14. Verwendung von den in den Ansprüchen 1 bis 13 beschriebenen,
5 nicht porösen Trennmaterialien mit einer modifizierten oder nicht
modifizierten Oberfläche zur Separation von Zellen und
Biomolekülen aus Mischungen, welche diese Zellen und
Biomoleküle enthalten, mittels der Gegenstrom-Chromatographie
mit kontinuierlicher Probenaufgabe und -entnahme unter
10 Ausnutzung sogenannter schwacher Wechselwirkungen, welche die
zu separierenden Zellen und Biomoleküle mit dieser Oberfläche
eingehen.

1/1

Abbildung 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/11520

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01D15/02 B01J20/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 B01D B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 645 729 A (J.W. PRIEGNITZ) 8 July 1997 (1997-07-08) column 4, line 36 - line 62 column 5, line 64 - column 6, line 16 column 3, line 24 - line 36 ---	1-3,5-8, 13,14
Y	EP 0 611 066 A (AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL) 17 August 1994 (1994-08-17) column 1, line 3 - line 5 column 2, line 17 - line 24 column 8, line 31 - line 40 ---	1-3,5-8, 13,14
A	US 5 626 762 A (J.W. PRIEGNITZ) 6 May 1997 (1997-05-06) column 5, line 66 column 4, line 13 - line 21 column 4, line 30 - line 38 ---	1,3,5,6

-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 Apr11 2001

Date of mailing of the international search report

23/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hilgenga, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Patent Application No.

PCT/EP 00/11520

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 290 406 A (PERSTORP BIOLYTICA) 9 November 1988 (1988-11-09) page 4, line 33 - line 35; claims 1,6 page 5, line 10 - line 17 page 4, line 3 - line 5 page 4, line 12 - line 23 ---	1-3,5-8, 13
A	DE 39 00 272 A (MÜLLER- SCHULTE) 12 July 1990 (1990-07-12) column 2, line 9 - line 27 column 3, line 46 -column 4, line 19 ---	1,3,5,6, 14
A	DE 196 29 208 A (MERCK PATENT GMBH) 22 January 1998 (1998-01-22) ---	
A	GOTTSCHLICH N ET AL: "CONTINUOUS BIOSPECIFIC AFFINITY PURIFICATION OF ENZYMES BY SIMULATED MOVING-BED CHROMATOGRAPHY THEORETICAL DESCRIPTION AND EXPERIMENTAL RESULTS" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, vol. 719, no. 2, 8 January 1996 (1996-01-08), pages 267-274, XP000544163 ISSN: 0021-9673 ---	
A	US 5 482 631 A (M. SASKA) 9 January 1996 (1996-01-09) column 3, line 5 -column 4, line 26; claims 1,7,13 -----	

Form PCT/ISA(210) (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/11520

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5645729	A	08-07-1997	US 5518625 A US 5626762 A	21-05-1996 06-05-1997
EP 611066	A	17-08-1994	GB 2274843 A JP 8010507 A	10-08-1994 16-01-1996
US 5626762	A	06-05-1997	US 5518625 A US 5645729 A	21-05-1996 08-07-1997
EP 290406	A	09-11-1988	SE 468653 B DE 3882797 A DE 3882797 T JP 63249052 A SE 8700949 A US 4879247 A	22-02-1993 09-09-1993 10-03-1994 17-10-1988 07-09-1988 07-11-1989
DE 3900272	A	12-07-1990	NONE	
DE 19629208	A	22-01-1998	DE 19501726 A WO 9803242 A EP 0921847 A JP 2000515802 T AT 194995 T DE 19624813 A DE 19627302 A DE 19627404 A DE 19628832 A DE 19629206 A DE 59605649 D WO 9622316 A EP 0804494 A JP 11502544 T US 5866673 A	25-07-1996 29-01-1998 16-06-1999 28-11-2000 15-08-2000 02-01-1998 08-01-1998 08-01-1998 22-01-1998 22-01-1998 31-08-2000 25-07-1996 05-11-1997 02-03-1999 02-02-1999
US 5482631	A	09-01-1996	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Antrags Aktenzeichen

PCT/EP 00/11520

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 B01D15/02 B01J20/32

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfschl (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01D B01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfschl gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, COMPENDEX

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 645 729 A (J.W. PRIEGNITZ) 8. Juli 1997 (1997-07-08) Spalte 4, Zeile 36 - Zeile 62 Spalte 5, Zeile 64 - Spalte 6, Zeile 16 Spalte 3, Zeile 24 - Zeile 36 ---	1-3,5-8, 13,14
Y	EP 0 611 066 A (AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL) 17. August 1994 (1994-08-17) Spalte 1, Zeile 3 - Zeile 5 Spalte 2, Zeile 17 - Zeile 24 Spalte 8, Zeile 31 - Zeile 40 ---	1-3,5-8, 13,14
A	US 5 626 762 A (J.W. PRIEGNITZ) 6. Mai 1997 (1997-05-06) Spalte 5, Zeile 66 Spalte 4, Zeile 13 - Zeile 21 Spalte 4, Zeile 30 - Zeile 38 ---	1,3,5,6

-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeliefert)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungstätiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungstätiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. April 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23/04/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2260 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Hilgenga, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Artenzeichen

PCT/EP 00/11520

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 290 406 A (PERSTORP BIOLYTICA) 9. November 1988 (1988-11-09) Seite 4, Zeile 33 - Zeile 35; Ansprüche 1,6 Seite 5, Zeile 10 - Zeile 17 Seite 4, Zeile 3 - Zeile 5 Seite 4, Zeile 12 - Zeile 23 ---	1-3,5-8, 13
A	DE 39 00 272 A (MÜLLER- SCHULTE) 12. Juli 1990 (1990-07-12) Spalte 2, Zeile 9 - Zeile 27 Spalte 3, Zeile 46 -Spalte 4, Zeile 19 ---	1,3,5,6, 14
A	DE 196 29 208 A (MERCK PATENT GMBH) 22. Januar 1998 (1998-01-22) ---	
A	GOTTSCHLICH N ET AL: "CONTINUOUS BIOSPECIFIC AFFINITY PURIFICATION OF ENZYMES BY SIMULATED MOVING-BED CHROMATOGRAPHY THEORETICAL DESCRIPTION AND EXPERIMENTAL RESULTS" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE. Bd. 719, Nr. 2, 8. Januar 1996 (1996-01-08), Seiten 267-274, XP000544163 ISSN: 0021-9673 ---	
A	US 5 482 631 A (M. SASKA) 9. Januar 1996 (1996-01-09) Spalte 3, Zeile 5 -Spalte 4, Zeile 26; Ansprüche 1,7,13 -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/11520

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5645729 A	08-07-1997	US 5518625 A US 5626762 A	21-05-1996 06-05-1997
EP 611066 A	17-08-1994	GB 2274843 A JP 8010507 A	10-08-1994 16-01-1996
US 5626762 A	06-05-1997	US 5518625 A US 5645729 A	21-05-1996 08-07-1997
EP 290406 A	09-11-1988	SE 468653 B DE 3882797 A DE 3882797 T JP 63249052 A SE 8700949 A US 4879247 A	22-02-1993 09-09-1993 10-03-1994 17-10-1988 07-09-1988 07-11-1989
DE 3900272 A	12-07-1990	KEINE	
DE 19629208 A	22-01-1998	DE 19501726 A WO 9803242 A EP 0921847 A JP 2000515802 T AT 194995 T DE 19624813 A DE 19627302 A DE 19627404 A DE 19628832 A DE 19629206 A DE 59605649 D WO 9622316 A EP 0804494 A JP 11502544 T US 5866673 A	25-07-1996 29-01-1998 16-06-1999 28-11-2000 15-08-2000 02-01-1998 08-01-1998 08-01-1998 22-01-1998 22-01-1998 31-08-2000 25-07-1996 05-11-1997 02-03-1999 02-02-1999
US 5482631 A	09-01-1996	KEINE	

Formblatt PCT/ISA210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

